

Keragaman Baru pada Daerah Ujung Gen Hormon Pertumbuhan Sapi Pesisir Ternak Lokal Sumatera Barat

New Diversity at the End of the Growth Hormone Gene of Local Cattle in West Sumatra

Yurnalis^{*1}, Arnim¹, Sarbaini¹ dan Jamsari²

¹Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang, 25163

²Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang, 25163

*E-mail: yurnalisunand@yahoo.com

(Diterima: 11 Juli 2017; Disetujui: 21 September 2017)

ABSTRAK

Dari 210 sampel sapi pesisir umur 1,5 tahun, dipilih 60 sample berdasarkan berat badan yaitu 30 sampel dengan berat tinggi ($125 \pm 9,02$ kg) dan 30 sampel dengan berat badan rendah ($65 \pm 6,09$ kg). Sampel darah 60 ekor sapi diisolasi dan produk PCR dari fragmen gen GH (455 bp) disekuensing forward dan reserve. Dua dileksi ditemukan pada posisi 2731 dan 2732 dengan frekuensi allel 0.06, dan 0.19. Delapan mutasi ditemukan pada posisi 2537, 2567, 2639, 2647, 2706, 2713, 2732, dan 2813 dengan genotipe $G \rightarrow T$, $G \rightarrow T$, $C \rightarrow G$, $T \rightarrow C$, $A \rightarrow G$, $C \rightarrow T$, $C \rightarrow T$, $C \rightarrow A$ dengan frekuensi allel berturut-turut 0,66; 0,97; 1,00; 0,54; 0,37; 0,62; 0,77 dan 1,00. Hasil penelitian ini menunjukkan gen GH pada sapi pesisir mempunyai keragaman yang tinggi, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui apakah keragaman ini berhubungan dengan sifat-sifat produksi.

Kata kunci: Sapi Pesisir, gen GH, Keragaman, SNP

ABSTRACT

From a total of 210 of 1,5-year-old Pesisir cattle, 60 were selected on the basis of weight, those were 30 with highest weight ($125 \pm 9,02$ kg) and 30 with lower weight ($65 \pm 6,09$ kg). DNA isolated from 60 blood sample and PCR product of GH fragment (455 bp) were analyzed by direct sequencing. Two deletions were detected in position 2731 and 2732 with frequency allele were 0.06, and 0.19. Eight mutation were detected in position 2537, 2567, 2639, 2647, 2706, 2713, 2732, and 2813 with genotypes $G \rightarrow T$, $G \rightarrow T$, $C \rightarrow G$, $T \rightarrow C$, $A \rightarrow G$, $C \rightarrow T$, $C \rightarrow T$, $C \rightarrow A$ with frequency allele were 0,66; 0,97; 1,00; 0,54; 0,37; 0,62; 0,77 and 1,00 respectively. These data provide evidence that GH gene is good polymorphic source and can be used for association with performance and investigate whether these polymorphic responsible for quantitative variation in growth.

Keywords: Pesisir cattle, growth hormone gene, polymorphism, SNP

PENDAHULUAN

Sapi pesisir adalah sapi lokal Sumatera Barat. Sapi Pesisir mempunyai potensi genetik yang baik karena mempunyai daya adaptasi tinggi, baik terhadap pakan yang berkualitas rendah, maupun terhadap perubahan suhu lingkungan (Yurnalis *et al.*, 2013) sehingga sapi pesisir jarang sekali terserang penyakit.

Sapi ini ukuran badannya relatif lebih kecil dibanding sapi-sapi jenis lainnya, seperti peranakan Ongole, sapi Bali, sapi Madura,

sapi Aceh. Meskipun tergolong sapi kecil, Sapi Pesisir memiliki persentase karkas cukup tinggi. Menurut Khasrad (2006) Sapi Pesisir persentase karkasnya 53%. Persentase karkas ini lebih tinggi dari persentase karkas sapi Ongole (48,8%), sapi Madura (47,2%), sapi PO (45%) dan kerbau (39,3%), namun sedikit lebih rendah dari persentase karkas sapi Bali (56,9%).

Seleksi yang terjadi pada Sapi Pesisir adalah seleksi alami yang berjalan kearah yang negatif yaitu ada kecenderungan sapi

yang dipertahankan adalah sapi yang bobot badannya lebih kecil, sedangkan sapi yang berbobot badan lebih besar dijual untuk mendapatkan harga yang lebih tinggi. Hal ini terjadi karena tingginya permintaan terhadap Sapi Pesisir terutama menjelang hari raya Idul Adha. Perbaikan genetik berpeluang untuk memacu peningkatan produktivitas dan kenaikan populasi ternak Sapi Pesisir. Namun demikian informasi mengenai Sapi Pesisir masih sangat terbatas, khususnya mengenai aspek biologis dan genetiknya. Untuk meningkatkan performa Sapi Pesisir disamping perbaikan sistem pemeliharaan, meningkatkan kondisi lingkungan seperti daya dukung lahan, juga harus dilakukan seleksi yang tepat.

Salah satu gen yang mempunyai peranan di dalam pertumbuhan suatu individu adalah gen hormon pertumbuhan (growth hormone/GH). Gen GH dibutuhkan untuk pertumbuhan jaringan, metabolisme lemak, pengaturan reproduksi, laktasi, pertumbuhan tubuh normal (Beauchemin *et al.*, 2006) dan sifat pertumbuhan pada sapi pedaging (Hale *et al.*, 2000). Selain itu gen hormon pertumbuhan berperan sebagai pengatur utama pertumbuhan setelah lahir dan proses metabolisme yang dapat mempengaruhi laju pertumbuhan, komposisi tubuh, kesehatan, produksi susu dan penuaan melalui penyesuaian dengan gen-gen lain (Ge *et al.*, 2003). Gen hormon pertumbuhan pada sapi pedaging merupakan salah satu gen kandidat yang berhubungan dengan bobot hidup (Reis *et al.*, 2001), penambahan bobot badan (Tambasco *et al.*, 2003) yang mengkode dan menghasilkan hormon pertumbuhan untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan sel ternak (Pierzchala *et al.*, 2004).

Gen bGH terletak di kromosom 19 pada posisi 19q26-qter (Woychik *et al.*, 1982; Hediger *et al.*, 1990) dan memiliki ukuran panjang urutan (*sequence*) nukleotida sebesar 2856 base pair (bp) yang terdiri atas lima exon dan dipisahkan oleh empat intron (Woychick *et al.*, 1982; Gordon *et al.*, 1983). Beberapa daerah polimorfik telah dilaporkan di wilayah

yang berbeda dari gen BGH. Polimorfisme di daerah exon dan intron memiliki potensi digunakan sebagai penanda genetik untuk perbaikan genetik populasi (Falaki *et al.*, 1996). Telah banyak penelitian mencari hubungan antara varian gen ini dan sifat-sifat produksi (Tatsuda *et al.*, 2008; Yardibi *et al.*, 2009; Matsushashi *et al.*, 2010; Mohammadabadi *et al.*, 2010; Maylinda, 2011; Sami, 2010; Sami *et al.*, 2011; Moravčiková *et al.*, 2012; Putra *et al.*, 2015).

Yurnalis *et al.* (2013) telah meneliti keragaman gen GH sapi Pesisir pada exon 4 dan sebagian intron 4 sedangkan penelitian tentang keragaman gen GH pada daerah ujung belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan menganalisis keragaman sekuen gen GH pada Sapi pesisir pada daerah ujung gen GH (*flankin 3'*) Penentuan keragaman genetik ini dapat dipakai sebagai informasi awal dalam rangka untuk melakukan seleksi genetik sapi Pesisir.

METODE

Sampel DNA

Sampel DNA yang digunakan berasal dari 60 sampel darah yang dipilih dari 210 sampel darah sapi pesisir pada peternakan rahyat yang diambil di Kecamatan Lengayang Kabupaten Pesisir Selatan. Enam puluh sampel darah terpilih merupakan sampel darah dari ternak sapi dengan bobot badan tertinggi sebanyak 30 sampel dan sampel darah dari ternak dengan bobot terendah sebanyak 30 sampel. Sampel darah diambil dari bagian vena jugularis, kemudian disimpan pada temperature -20°C. Isolasi DNA dari sampel darah dilakukan menggunakan genomic DNA purification kit Promega.

Primer

Amplifikasi gen GH exon 5 dan daerah ujung dilakukan dengan mesin *thermal Cycler eppendorf* dilakukan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi ruas gen GH pada daerah *exon 5* dan

daerah ujung adalah primer forward 5'-cactccactgtccttctcta-3' dan primer *reserved* 5'-acttctcacatgttgaggc-3' (Yao *et al.*, 1996).

Amplifikasi Fragmen Gen GH

Amplifikasi ruas gen hormon pertumbuhan dilakukan menggunakan metode PCR. Pereaksi yang digunakan untuk amplifikasi kedua ruas gen target adalah 2 µl sampel DNA cetakan, campuran primer 5 pmol sebanyak 3 µl, master mix 25 µl (*Thermo Scientific*) dalam larutan total 50 µl. Amplifikasi *in vitro* dengan mesin *thermal cycler* dilakukan dengan kondisi denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, 40 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, annealing pada suhu 62°C selama 45 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Kemudian fragmen hasil amplifikasi PCR dielektroforesis gel yang berisikan fragmen target diisolasi dari gel agarose selanjutnya dipurifikasi menggunakan Nucleo Spin Purifikasi Kit selanjutnya dikirim untuk sekuensing.

Hasil sekuen yang diperoleh dilihat keragamannya dan diuji kesamaannya antar jenis sapi maupun dengan bangsa sapi lain yang ada di *Gen Bank* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST]. Selain mendapatkan kesamaan sekuen, juga diidentifikasi secara pasti posisi ada tidaknya mutasi atau terjadinya indel pada gen hormon pertumbuhan pada Sapi Pesisir.

Analisis Data

Analisis statistik deskriptif untuk memperoleh karakterisasi bobot tubuh dan ukuran-ukuran-ukuran tubuh pada sapi Pesisir dilakukan dengan menghitung rata-rata (\bar{x}), simpangan baku (s), dan koefisien keragaman (KK) dengan prosedur berikut (Steel *et al.*, 1997).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n-1}, \text{ dan}$$

$$KK(\%) = \frac{s}{\bar{x}} (100\%)$$

Dimana x_i adalah ukuran ke i peubah X , n jumlah sampel.

Analisis deskriptif untuk melihat keragaman sekuen GH dilakukan sebagai berikut.

Frekuensi Genotipe

Frekuensi genotipe dihitung berdasarkan jumlah alel suatu genotipe dibagi dengan jumlah sample :

$$F_1 = \frac{\sum x_i}{N} ; x_i = \text{genotipe yang diamati}$$

Frekuensi alel dihitung dengan menjumlah semua alel dibagi dengan $2N$:

$$F_2 = \frac{\sum x_i}{2N} ; x_i = \text{alel yang diamati}$$

Uji χ^2 (Chi-Square)

Untuk menguji apakah ada hubungan antara SNP dengan dengan dua kelompok berat badan diuji dengan uji χ^2 ;

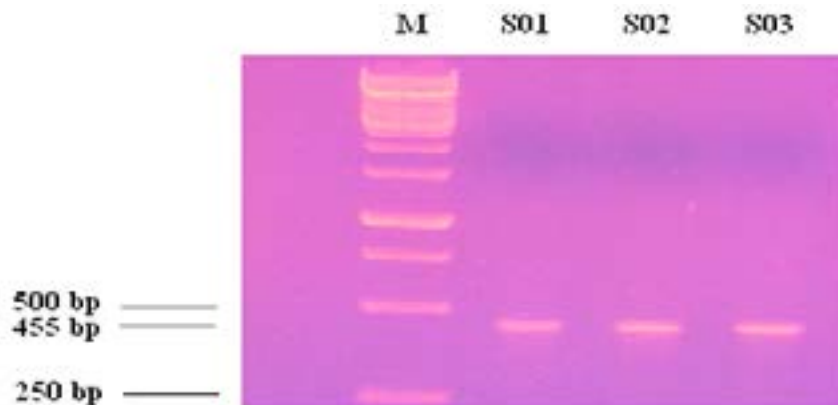
$$\chi^2 = \sum \sum \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Keterangan :

χ^2 = Uji Chi-Square

O_{ij} = jumlah pengamatan genotip ke i kelompok berat badan ke j

E_{ij} = jumlah harapan genotip ke i kelompok berat badan ke j .



Gambar 1. Elektroforesis hasil amplifikasi daerah ujung gen GH (Keterangan : M = Marker, S01-S03 = sampel individu).

Tabel 1. Polimorfisme gen GH

No	Mutasi	Posisi	Frekuensi Allele
1	G → T	2537	0,66
2	G → T	2567	0,97
3	C → G	2639	1,00
4	T → C	2647	0,54
5	A → G	2706	0,37
6	C → T	2713	0,62
7	Delesi T	2731	0,06
8	C → T	2732	0,77
9	Delesi C	2732	0,19
10	C → A	2813	1,00

HASIL DAN PEMBAHASAN

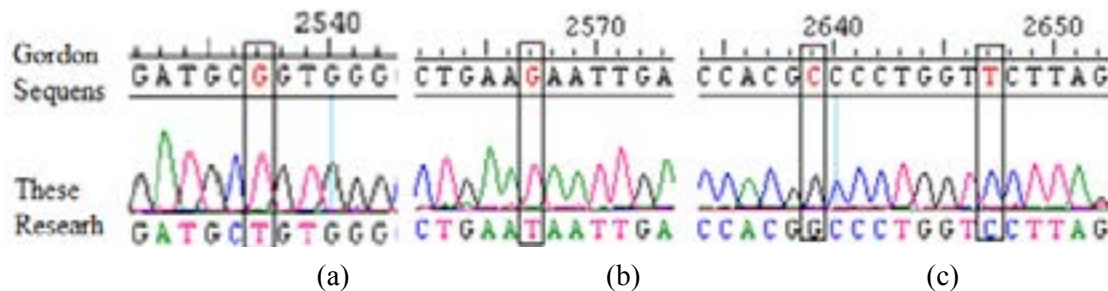
Amplifikasi PCR menggunakan pasangan primer yang digunakan menghasilkan fragmen sepanjang 455 bp pada daerah intron 5 (Gambar 1). Dengan teknik pensejajaran diperoleh tingkat kesamaan sekuen dengan sekuen Gordon *et al.* (1983) dan Woichick (1990) sebesar 96 - 97 % yang membuktikan sekuen yang teramplifikasi adalah benar sekuen dari gen hormon pertumbuhan.

Dengan membanding hasil sekuensing 455 bp fragmen dengan Gordon *et al.* (1983) pada daerah flanking 3' dijumpai adanya 2 delesi baru (Tabel 1), yaitu delesi T pada posisi 2731, dan delesi C pada posisi 2732 dengan frekuensi alel 0,06; dan 0,19. Juga

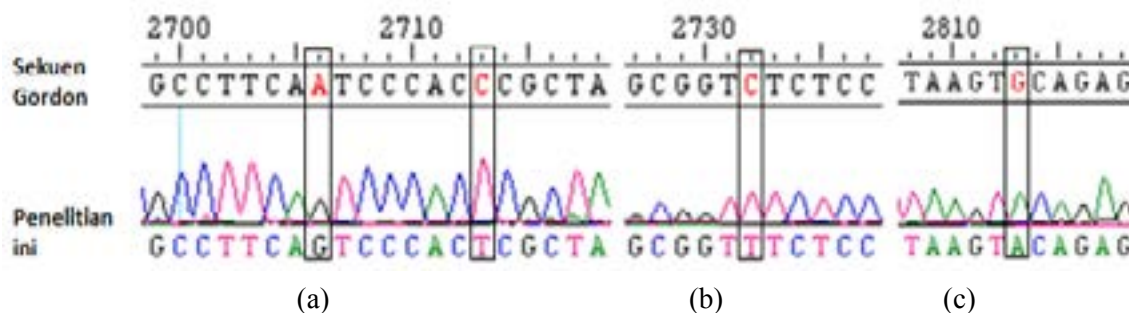
ditemukan 8 substitusi baru yaitu mutasi G → T pada posisi 2537 dan 2567, mutasi C → G pada posisi 2639, mutasi T → C pada posisi 2647, mutasi A → G pada posisi 2706, mutasi C → T pada posisi 2713 dan 2732, dan mutasi C → A pada posisi 2813 dengan frekuensi alel berturut-turut 0,66; 0,97; 1,00; 0,54; 0,37; 0,62; 0,77; dan 1,00.

Dari 10 polimorfisme pada daerah ujung gen GH pada sapi Pesisir 8 diantaranya bersifat polimorfik dan yang lainnya bersifat monomorfik (Tabel 1) sehingga berpotensi untuk dijadikan marker genetik dan dapat diuji lebih lanjut untuk dapat dijadikan kandidat marker. Mutasi G → T pada posisi 2537 (Gambar 2a) juga hanya bisa dideteksi dengan sekuensing.

Mutasi G → T pada posisi 2567



Gambar 2. Keragaman pada posisi 2537, 2567, 2639, dan 2647.



Gambar 3. Keragaman Pada Posisi 2706, 2713, 2732, dan 2813.

(Gambar 2b) juga pernah dilaporkan oleh Lagziel *et al.* (1999), mutasi ini akan merubah sisi pemotong enzim *NcuI* (\downarrow GAAGA) sehingga jika terjadi mutasi, sekuen tidak akan terpotong dengan enzim *NcuI*. Mutasi C \rightarrow G pada posisi 2639 (Gambar 2c) akan membentuk sisi pengenalan enzim *Eco47I* (GG \downarrow WCC) atau *HaeIII* (GG \downarrow CC) sehingga jika terjadi mutasi sekuen akan terpotong oleh enzim *Eco47I* atau *HaeIII*. Mutasi T \rightarrow C pada posisi 2647 (Gambar 2c) akan membentuk sisi pengenalan enzim *AvaII* (G \downarrow GWCC) sehingga jika terjadi mutasi sekuen akan terpotong jika di restriksi dengan enzim *AvaII*.

Mutasi C \rightarrow T pada posisi 2713 (Gambar 3a) akan merubah sisi pemotong enzim *Acil* (C \downarrow CCG) sehingga jika tidak ada mutasi sekuen akan terpotong jika direstriksi dengan enzim *Acil*. Delesi T pada posisi 2731 (GTCTC \rightarrow GCTC) akan merubah sisi pemotong enzim *BscqII* (\downarrow GTCTC) sehingga jika tidak ada delesi sekuen dapat terpotong dengan enzim *BscqII*. Mutasi pada posisi 2732 (Gambar 3b) akan merubah sisi pemotong enzim *Eco3II* (GGTCTCN \downarrow NNNN) dan mutasi G \rightarrow C pada posisi 2768 akan merubah

sisi pemotong Enzim *Bfal* (C \downarrow TAG) sehingga jika terjadi mutasi sekuen tidak akan terpotong jika didestriksi dengan enzim *Bfal*. Demikian juga mutasi C \rightarrow A pada posisi 2813 (Gambar 3c) akan merubah sisi pemotong dari enzim *CviRI* (TG \downarrow CA). Keragaman pada posisi 2713, 2731, 2732, 2768, dan 2813 belum pernah sebelumnya ditemukan pada sapi lain. Mutasi C \rightarrow G pada posisi 2639 dan mutasi G \rightarrow B pada posisi 2813 terjadi pada semua sampel, mutasi ini perlu dikaji lebih lanjut untuk sampel yang lebih besar dan kemungkinan sebagai pananda pada sapi Pesisir.

Hasil uji *chi-square* (X^2) menunjukkan tidak adanya hubungan yang nyata antara dua kelompok bobot badan dan ukuran-ukuran tubuh dengan keragaman sekuen. Hal ini disebabkan bobot badan dan ukuran-ukuran tubuh selain dipengaruhi factor genetik juga sangat dipengaruhi oleh factor lingkungan seperti makanan dan sistim pemeliharaan. Dengan adanya 10 keragaman pada daerah ujung menunjukkan sapi Pesisir sekuensnya sangat beragam.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan gen GH pada sapi pesisir mempunyai keragaman yang tinggi, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui apakah keragaman ini berhubungan dengan sifat-sifat produksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Falaki, M., N. Gengler, M. Sneyers, A. Prandi, S. Massart, A. Formigoni, A. Burny, D. Portetelle and R. Renaville. 1996. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 79:1446–1453.
- Beauchemin, V. R., M. G. Thomas, D. E. Franke and G. A. Silver. 2006. Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. *Genet. Mol. Res* 5:438-447.
- Ge, W., M. E. Davis, H. C. Hines, K. M. Irvin and R. C. M. Simmen. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 81:641–648.
- Gordon, D. F., D. P. Quick, C. R. Erwin, J. E. Donelson and R. A. Maurer. 1983. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 33:81–95.
- Hediger, R., S. E. Johnson, W. Barendse, R. D. Drinkwater, S. S. Moore and J. Hetzel. 1990. Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in-situ hybridization. *Genomics* 8:171–174.
- Hale, C. S., W. O. Herring, H. Shibuya, M. C. Lucy, D. B. Lubahn, D. H. Keisler and G. S. Johnson. 2000. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of growth hormone receptor gene. *J. Anim. Sci.* 78:2099–2104.
- Lagziel, A., E. Lipkin, E. Ezra, M. Soller and J. I. Weller. 1999. An MspI Polymorphism at the bovine growth hormone (bGH) gene is linked to a locus affecting milk protein percentage. *Anim. Genet.* 30:296-299
- Matsushashi, T., S. Maruyama, Y. Uemoto, N. Kobayashi, H. Mannen, T. Abe, S. Sakaguchi and E. Kobayashi. 2011. Effects of bovine fatty acid synthase, stearyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.* 2011. 89:12–22
- Maylinda, S. 2011. Genetic polymorphism of growth hormone locus and its association with bodyweight in Grati dairy cows. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research* Vol. 2(7):117-120.
- Moravčíková, N., A. Trakovická and E. Hazuchová. 2012. The Association of Bovine Growth Hormone Gene Polymorphism with Milk Performance Traits in Slovak Spotted Cows. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies.* 45:20-210.
- Pierzchala, M., T. Blicharski and J. Kuryl. 2004. Growth rate and carcass quality in relation to GHIMspl and GHIMaell PCR-RFLP polymorphism in pig. *Animal Science Papers and Report* 22:57-64.
- Putra, D. E., Sumadi, T. Kanazawa and T. Hartatik. 2015. Short Communication: Identification of Growth Hormone gene polymorphism for beef cattle in Pesisir Selatan District, West Sumatra,

- Indonesia. Biodiversitas. 17(2): 711-715.
- Reis, C., D. Navas, N. Pereira and A. Cravador. 2001. Growth hormon Alul polymorphism analysis in eight Portuguese bovine breeds Arch. Zootec. 50:41-48.
- Sami, A. J. 2009. Deletion of amino acid residues 33-46 in growth hormone alters the hydrophobicity of the molecule. African Journal of Biotechnology 9 (5): 711-717
- Sami, A. J., M. T. Nazir, Z. Jabeen and A. R. Shakoori. 2011. Gene study within the 5' flanking regions of growth hormone gene of first exon in *Bos indicus*. African Journal of Biotechnology 10(3): 332-336.
- Tambasco, D. D., C. C. P. Paz, M. T. Stuart, A. P. Pereira, M. M. Alencar, A. R. Freitas, L. L. Coutinho, I. U. Packer and L. C. A. Regitano. 2003 Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. Abstract. J. An. Breeding and Genetics. 120:51
- Tatsuda, K., A. Oka, E. Iwamoto, Y. Kuroda, H. Takeshita, H. Kataoka, and S. Kouno. 2008. Relationship of the Bovine Growth Hormone Gen to Carcass Traits in Japanese Black Cattle. J. Anim. Breed. Genet. 125 : 45 - 49
- Woychik, R. P., S. A. Camper, R. H. Lyons, S. Horowitz, E. C. Goodwin and F. M. Rottman. 1982. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. Nucleic Acids Res. 10:7197-7210.
- Yao, J. B., S. E. Aggrey, D. Zadworny, J. F. Hayes and U. Kuhnlein. 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. Genetics 144:1809-1816.
- Yardibi, H., H. T. Hosturk, I. Paya, F. Kaygisiz, G. Ciftioglu, A. Mengi and K. Oztabak. 2009. Associations of Growth Hormone Gene Polymorphisms with Milk Production Traits in South Anatolian and East Anatolian Red Cattle. J. Anim. Vet. Adv., 5: 1040-1044.
- Yurnalis, Sarbaini, Arnim, Jamsari and Wolfgang Nellen. 2013. Identification Single Nucleotide Polymorphism of Growth Hormone Gene Exon 4, Intron 4 in Sapi pesisir Local Cattle breeds in West Sumatera Province of Indonesia. African Journal of Biotechnology. Vol 12(3).
- Zakizadeh, S., G. Rahimi, S. R. Mirae-Ashtiani, A. Nejati-Javaremi, M. Moradi-shahrbabak, P. Reinecke, M. Reissmann, A. A. Masoudi, C. Amirinia and S. A. Mirhadi. 2006. Analysis of Bovine Growth Hormone Gene Polymorphism in Three Iranian Native Breeds and Holstein Cattle by RFLP-PCR. Biotechnology 5(3): 385-390.
- Zhang, H. M., D. R. Brown, S. K. Denise, and R. L. Ax. 1993. Rapid communication: polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism analysis of the bovine somatotropin gen. J. Anim. Gent. 71:2276.
- Zhou, G. L., H. G. Jin, C. Liu, S. L. Guo, Q. Zhu and W. Y. Hou. 2005. Associated of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. J. Biosci. 30: 595-598.